

Skrining Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Molekuler Berdasarkan Gen 16S rRNA Isolat Aktinomiset Asal Pulau Enggano dan Bali

Rahmah Qisti Nandina¹, Sri Pujiyanto¹, Wijanarka¹, Fahrurrozi²

¹Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi FSM Undip
Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro
Semarang 50275 Tlp. (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

²Laboratorium Mikrobiologi Terapan Bioteknologi LIPI
Email: rahmah_qisti@yahoo.co.id

ABSTRACT

Actinomycetes are a Gram positive bacteria who plays an important role in pharmaceutical industry because of its ability to produce an antibacterial compound. This study aims to select actinomycetes isolates that has antibacterial activity and to identify the isolates based on 16S rRNA gene sequence. The actinomycetes isolates were inoculated using ISP-2 medium and cultured in SYP (starch, yeast, peptone) media for 13 days. The cultures were extracted using ethyl acetate solvent and antibacterial activity was tested against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* using agar diffusion method. Positive isolates were identified based on 16S rRNA gene sequence. The 16S rRNA gene from positive isolates was sequenced and analyzed with computerized help and was deposited at NCBI. The antibacterial activity test revealed 5 from 22 isolates had an antibacterial activity shown by the clear zone around the Whatman filter paper on both tested bacteria. The identification revealed these five isolates were identified as *Streptomyces mutabilis*, *Streptomyces sp.*, and *Streptomyces griseorubens*. This study shows these isolates from Enggano and Bali Island are potential as antibacterium producer.

Keywords : actinomycetes, antibacterial activity, 16S rRNA.

ABSTRAK

Aktinomiset merupakan bakteri Gram positif yang mampu memproduksi senyawa metabolit sekunder. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi isolat aktinomiset yang memiliki aktivitas antibakteri dan mengidentifikasinya berdasarkan gen 16S rRNA. Isolat aktinomiset diremajakan pada medium ISP-2 kemudian dikultur pada medium cair SYP (starch, yeast, peptone) selama 13 hari. Kultur diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dan aktivitas antibakteri diuji terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* dengan metode difusi agar. Isolat positif diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA dari kelima isolat disekuens dan dianalisis dengan bantuan komputerisasi BLAST dan pada basis data NCBI. Hasil uji aktivitas antibakteri dari 22 isolat diperoleh 5 isolat memiliki aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya daerah bening disekitar kertas cakram pada kedua bakteri uji. Identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA kelima isolat ini teridentifikasi sebagai *Streptomyces mutabilis*, *Streptomyces sp.*, dan *Streptomyces griseorubens*.

Kata kunci : aktinomiset, aktivitas antibakteri, 16S rRNA.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi (Infectious diseases) adalah penyakit yang disebabkan oleh

mikroba patogen. Secara umum proses terjadinya penyakit melibatkan tiga faktor yang saling berinteraksi yaitu : faktor penyebab penyakit (agen), faktor manusia atau pejamu (host), dan faktor lingkungan. Profil data kesehatan Indonesia tahun 2014, menyebutkan terdapat beberapa kasus infeksi bakteri di Indonesia, seperti tuberkulosis yang disebabkan infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan 183 kasus per 100.000 penduduk, difteri yg disebabkan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dengan 396 kasus dan 16 diantaranya meninggal, tetanus yg disebabkan oleh bakteri *Clostridium tetani* dengan 84 kasus dan 54 diantaranya meninggal, dan penyakit kusta yg disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium leprae* dengan 17.025 kasus.

Pengobatan penyakit infeksi tergantung dari penyebabnya. Jika disebabkan oleh jamur, maka diobati dengan antijamur, jika oleh virus maka diobati dengan antivirus, jika oleh bakteri maka diobati dengan antibakteri atau sering disebut antibiotik. Antibiotik merupakan obat pilihan utama dalam mengatasi penyakit infeksi, terutama yang diakibatkan oleh bakteri, namun demikian, selain masalah toksisitas dan efek samping yang ditimbulkan, resistensi bakteri terhadap antibiotik saat ini semakin meningkat dan menjadi masalah utama dalam mengatasi penyakit infeksi. Kebutuhan antibiotik barumasih sangat tinggi, terutama yang efektif melawan mikroba patogen yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotik.

Antibiotik mempunyai nilai ekonomi tinggi di bidang kesehatan, karena kegunaannya untuk mengobati berbagai jenis penyakit infeksi. Cara utama dalam menemukan antibiotika yaitu melalui 'screening'. Sejumlah isolat mikroorganisme penghasil antibiotik yang diperoleh dari alam, diuji dengan bakteri uji. Bakteri yang digunakan untuk pengujian, dipilih dari berbagai tipe, dan

mewakili atau berhubungan dengan bakteri patogen.

Aktinomiset dikenal sebagai bakteri penghasil antibiotik, karena lebih dari 10.000 antibiotik yang telah ditemukan, dua pertiganya dihasilkan oleh bakteri ini. Sebagai penghasil senyawa antibiotik, aktinomiset banyak digunakan dalam industri obat, pakan ternak atau unggas, pengawetan makanan, pertanian, dan perikanan. (Susilowati et.al, 2007). Aktinomiset menjadi kelompok terbesar sebagai sumber daya mikroba yang menghasilkan antibiotika dan juga memproduksi berbagai metabolit bioaktif nonantibiotika, seperti enzim, inhibitor enzim, regulator imunologi, antioksidasi reagen.

Aktinomiset memiliki potensi besar untuk mensintesis metabolit sekunder bioaktif. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melakukan seleksi isolat aktinomiset asal Pulau Enggano dan Bali penghasil senyawa antibakteri dan melakukan identifikasi terhadap isolat penghasil senyawa antibakteri berdasarkan gen 16S rRNA.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Isolat

Bahan-bahan yang digunakan adalah 22 isolat aktinomiset koleksi bioteknologi LIPI asal Pulau Enggano dan Bali, media ISP-2, media SYP, bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*, TE buffer, Tris-HCl, NaCl, EDTA, SDS, sodium asetat, dan isopropanol.

Peremajaan Isolat Aktinomiset

Isolat Aktinomiset diremajakan pada media ISP-2 yang terdiri dari 4 g ekstrak ragi, 10g ekstrak malt, 4 g glukosa, dan 20 g agar dalam 1liter air dengan masa inkubasi 7-14 hari (Ratnakomalasari et.al, 2016).

Produksi Aktinomiset pada Kultur Cair

Produksi aktinomiset pada kultur cair menggunakan media SYP (*Starch, yeast, peptone*). Produksi awal aktinomiset dilakukan dengan membuat pre-kultur aktinomiset pada 5 ml SYP di dalam tabung reaksi. Isolat aktinomiset pada cawan petri diambil menggunakan sedotan steril sebanyak 1 sedotan dan di hancurkan menggunakan tusuk sate di tabung reaksi. Pre-kultur diinkubasi selama 3 hari pada inkubator shaker 120 rpm. Setelah 3 hari pre-kultur dipindahkan ke dalam media kultur yaitu 95 ml SYP. Kulture diinkubasi kembali di *incubator shaker* pada suhu 27-30 °C selama 10 hari (Nurkanto *et.al*, 2012).

Ekstraksi Senyawa Aktif Aktinomiset

Ekstraksi dilakukan menggunakan 100 ml pelarut etil asetat pada kultur aktinomiset. Kultur diinkubasi pada shaker selama 1 jam untuk memaksimalkan pelarutan senyawa aktif dari aktinomiset. Etil asetat selanjutnya dipisahkan dari kultur dan dievaporasi pada suhu 50°C sampai tersisa kurang lebih 3 ml. Hasil ekstraksi selanjutnya dimasukkan ke dalam vial gelas lalu diuapkan kembali sampai mengering. Ekstrak dikeringkan dan ditimbang. Pelarut Metanol digunakan ketika ekstrak akan digunakan. Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar (Astarina, 2013).

Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Bakteri uji diremajakan pada media NA dan diinkubasi selama 24 – 48 jam. Bakteri uji yang telah diremajakan, ditumbuhkan kembali pada 5 ml media NB dan di shaker selama 24 jam sebelum digunakan (wahyuni *et.al*, 2014).

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Aktinomiset

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan 2 lapis media Mueller Hinton (lapisan bawah dan lapisan atas). Lapisan bawah merupakan 10 – 15 ml Mueller Hinton, sedangkan lapisan atas adalah 5 ml Mueller Hinton dengan komposisi ½ resep. Bakteri Uji dengan nilai transmitan 25% pada panjang gelombang 580 nm (kementrian kesehatan Indonesia, 2010) ditambahkan pada lapisan atas dan dituang ke cawan petri yang sudah dituang lapisan bawah sebelumnya. Bakteri uji diinokulasikan pada media sebanyak 0,2% *E.coli* dan 0,1% *B.subtilis* (Miyadoh dan Otoguro, 2004).

Ektrak diteteskan pada papper disk 5mm sebanyak 30µl dengan dua kali penetasan dan dibiarkan sampai mengering. Papper disk diletakkan pada permukaan Mueller Hinton yang telah diinokulasikan bakteri uji. Papper disk dengan tetesan methanol dan kloramfenikol digunakan sebagai kontrol (Wahyuni *et.al*, 2004).

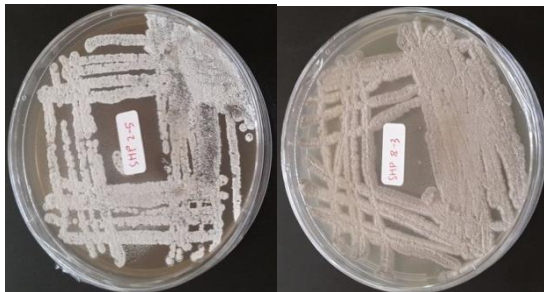
Amplifikasi Gen 16S rRNA

Endapan aktino pada kultur murni sebanyak 1 ml disentrifuge selama 5 menit pada 13.000 rpm. Pellet kemudian digunakan untuk ekstraksi DNA dengan metode sederhana hasil modifikasi LIPI dengan rujukan lisdiyanti *et.al* (2001). Primer 9F (forward :5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1541R (reverse: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') digunakan untuk mengamplifikasi gen 16S rDNA pada reaksi PCR. Primer ini akan menghasilkan ampikon sepanjang 1500bp. PCR dilakukan menggunakan Kappa 2G fast master kit dengan total volume 50 µl yang terdiri dari 20 µL dH₂O, 25 µL PCR master mix, 2 µL primer 9F (20 pmol), 2 µL primer 1541R (20 pmol), and 1 µL DNA template. PCR dilakukan dengan kondisi denaturasi awal pada 96 °C selama 5 menit, denaturasi pada 96°C selama 30 detik, annealing pada 55°C selama 30 detik, elongasi pada 72°C

selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C for 7 min. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel pada 1x TE buffer (Aeny *et.al*, 2018). Produk PCR dikirimkan ke Genetika Science untuk reaksi sekuens. Hasil sekuens dianalisis menggunakan program BioEdit dan dianalisis BLAST pada situs NCBI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Peremajaan Isolat Aktinomiset selama 7- 14 hari membentuk isolat yang berspora ditandai dengan munculnya spora yang menyerupai serbuk (gambar1).



Gambar 1. Morfologi Makroskopis Isolat Aktinomiset hasil peremajaan umur 7-14 hari.

Isolat ditumbuhkan pada kultur starter (5 ml SYP). Kultur starter selanjutnya disubkultur pada media dengan volume yang lebih besar dan diinkubasi selama selama 13 hari. Isolat Aktinomiset, pada kultur cair akan membentuk granul dan memiliki larutan yang jernih. Kultur starter dibuat agar ada proses penyesuaian aktinomiset dengan media yang digunakan dan agar pertumbuhan sudah mencapai fase eksponensial, yaitu fase pertumbuhan sel yang paling optimal. Pada umumnya selama 13 hari tersebut, Actinomycetes sudah memasuki fase stasioner (Sulistiyani dan Mulyadi 2013).

Ekstraksi senyawa aktif dari isolat aktinomiset menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut polar yang mampu menarik metabolit sekunder dengan jumlah paling banyak dari cairan

fermentasi apabila dibandingkan dengan n-heksan ataupun kloroform (Sulistiyani; Akbar, 2014). Penambahan etil asetat pada kultur cair aktinomiset membentuk dua lapisan yang disebut supernatan (lapisan atas berwarna bening) dan subnatan (lapisan bawah). Supernatan adalah lapisan cairan etil asetat yang diperkirakan telah melarutkan senyawa aktif antibakteri.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hasil penapisan pada 22 isolat aktinomiset terhadap bakteri uji, menunjukkan bahwa dari 22 isolat, terdapat 5 isolat yang memiliki daya hambat terhadap bakteri uji dan 17 isolat tidak memiliki daya hambat. Kadar ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang sudah dilarutkan pada metanol sebanyak 1 ml sebagai ekstrak pekat dan ekstrak yang sudah diencerkan 10x. Variasi kadar dilakukan dengan tujuan untuk melihat perbedaan diameter hambat dari masing-masing kadar yang digunakan. Isolat positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar papper disk. 5 isolat yang memiliki aktivitas antibakteri adalah SHP 22-7, SHP 2-1, BSE 7F, BSE 7-9, dan BSE 11A.. Hasil pengukuran diameter zona bening ditunjukkan pada Tabel 1.

Menurut Davis dan Stout (2009), jika diameter daerah hambatan kurang dari 5 mm maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah, daerah hambatan 5 – 10 mm dikategorikan sedang, daerah hambatan 10 – 20 mm dikategorikan kuat dan jika diameter hambatan lebih dari 20 mm maka dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kategori tersebut isolat SHP 22-7 dan BSE 7F tergolong pada katagori daya hambat sedang, baik pada kadar ekstrak pekat maupun kadar ekstrak yang

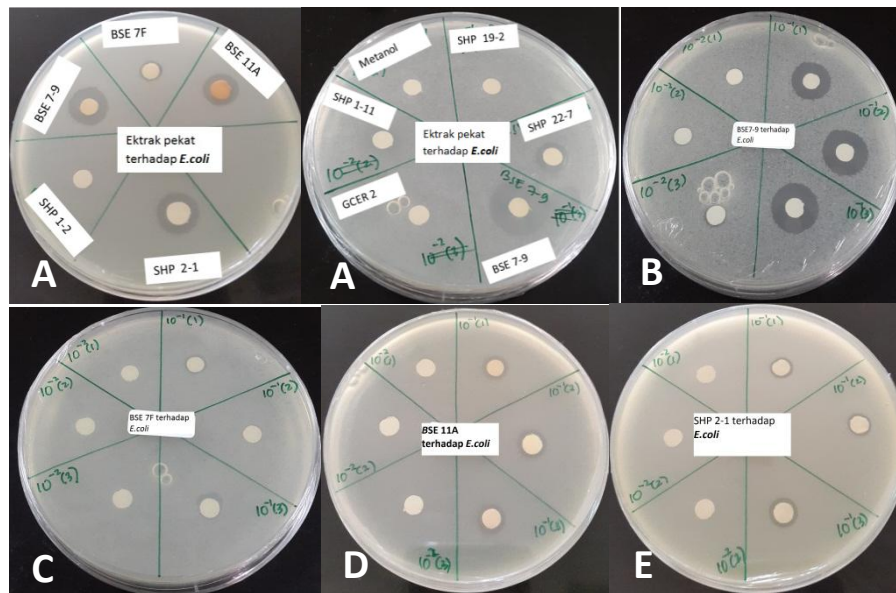
Tabel 1. Hasil pengukuran diameter zona bening yang dihasilkan terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

Kadar isolat	kode isolat	Daya Hambat (mm)	
		<i>B.Subtilis</i>	<i>E.coli</i>
Ektrak pekat	SHP 22- 7	9	8
	BSE 7F	9	8
	BSE 7-9	18	16
	SHP 2-1	22	12
	BSE 11A	12	13
Pengenceran 10 ^x	SHP 22- 7	-	6.3
	BSE 7F	7.3	7.3
	BSE 7-9	11.3	14
	SHP 2-1	14.6	8,3
	BSE 11A	9.3	8,3
Kontrol Positif	kloramfenikol	35	20
Kontrol Negatif	Aquades	-	-
	Metanol	-	-

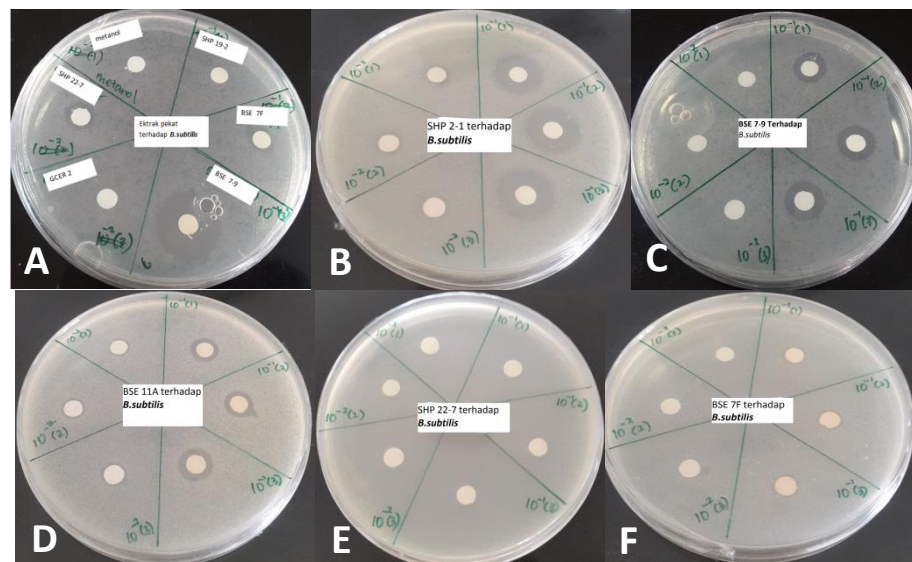
telah diencerkan. BSE 7-9 dapat dikategorikan pada aktivitas penghambatan kuat pada kedua kadar ekstrak uji. SHP 2-1 tergolong kategori sangat kuat pada ekstrak pekat dan kategori kuat pada ekstrak yang diencerkan. Sedangkan BSE 11A tergolong pada kategori penghambatan kuat untuk ekstrak yang pekat, dan kemampuannya menurun menjadi kategori sedang pada ekstrak yang telah diencerkan. Menurut Rahmah *et.al* (2017), kemampuan suatu antimikroba dalam menghambat mikroorganisme tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba dan jenis bahan antimikroba yang dihasilkan. Semakin besar konsentrasi suatu antimikroba, maka semakin besar zona bening yang terbentuk. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi bahan antimikroba, maka semakin banyak zat aktif yang terkandung di dalamnya sehingga efektivitas dalam menghambat bakteri akan semakin meningkat dan menghasilkan zona bening yang lebih luas. Sebaliknya, pada konsentrasi yang rendah maka zat antimikroba yang terdapat di dalam suatu bahan antimikroba akan semakin sedikit, sehingga aktivitasnya akan semakin berkurang.

Berdasarkan hasil pengamatan dan pengukuran yang dilakukan, kelima ekstrak isolat aktinomiset tersebut mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji yang merupakan perwakilan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Hal ini menunjukkan senyawa yang dihasilkan kemungkinan tergolong dalam antibiotika spektrum luas. Menurut Wahyuni (2014), ruang lingkup antibakteri terbagi menjadi 3 bagian. Pertama, antibiotika spektrum luas (board spectrum) yaitu senyawa antibiotika yang dapat menghambat berbagai macam mikroba. Kedua antibiotika spektrum terbatas (limited spectrum) apabila antibiotika tersebut efektif menghambat organisme tunggal atau organisme penyebab penyakit tertentu. Ketiga, antibiotika berspektrum sempit (narrow spectrum) yang hanya efektif menghambat sebagian bakteri Gram positif atau Gram negatif.

Pengamatan dan pengukuran terhadap aktivitas antibakteri dilakukan pada 24 jam dan 48 jam. Dari pengamatan tersebut diperoleh hasil bahwa zona hambat yang terbentuk tidak berubah dan tidak terlihat bahwa intensitas zona bening berkurang. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* (A) ekstrak pekat (B) ekstrak encer BSE 7-9 (C) ekstrak encer BSE 7F (D) ekstrak encer BSE 11A (E) ekstrak encer SHP 2-1



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* (A) ekstrak pekat (B) ekstrak encer SHP 2-1 (C) ekstrak encer BSE 7-9 (D) ekstrak encer BSE 11A (E) ekstrak encer SHP 22-7 (F) ekstrak encer BSE 7F.

senyawa antibakteri dari isolat aktinomiset yang diperoleh bersifat bakteriosidal. Senyawa dengan aktivitas antibakteri terbagi menjadi bakteriostatik dan bakteriosidal. Bakteriostatik dideskripsikan sebagai suatu agen yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri untuk sementara waktu. Ketika kadar obat sudah berkurang atau habis, maka bakteri akan kembali tumbuh.

Sedangkan bakteriosidal dideskripsikan sebagai suatu agen antibakteri yang menyebabkan kematian terhadap bakteri tersebut. (Adzitey, F 2015).

Gen 16S rRNA digunakan sebagai acuan untuk identifikasi bakteri karena gen ini merupakan gen yang paling tahan terhadap perubahan atau evolusi. Hasil identifikasi pada BLAST ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Isolat Aktinomiset berdasarkan gen 16S rRNA

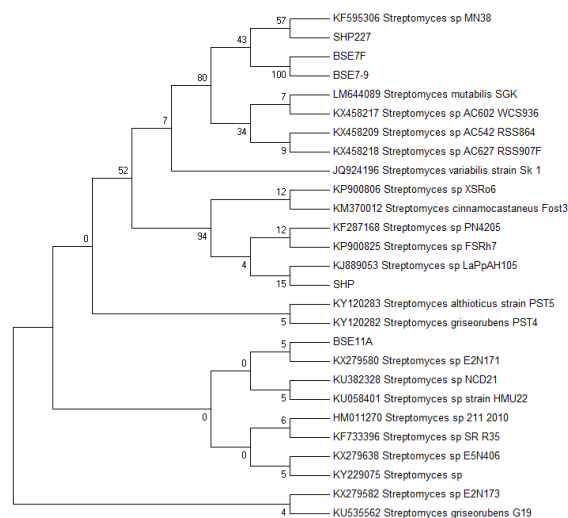
Kode Isolat	Teridentifikasi Sebagai	kemiripan	Accession
SHP 22- 7	<i>Streptomycesmutabilis</i>	99%	KY120282.1
SHP 2-1	<i>Streptomycessp. SRh7</i>	99%	KY120282.1
BSE 7-9	<i>Streptomycesgriseorubens</i>	99%	KF733396.1
BSE 7F	<i>Streptomycesgriseorubens</i>	99%	LM644089.1
BSE 11A	<i>Streptomyces sp. SR-R35</i>	99%-	KP900825.1

Hasil ini sesuai dengan pendapat Anderson & Wellington (2001) yang menyatakan bahwa aktinomisetes terutama genus *Streptomyces* merupakan penghasil utama antibiotik, dan dua pertiga antibiotik yang telah dipasarkan saat ini dihasilkan oleh *Streptomyces*. Hal ini juga selaras dengan penelitian Ratnakomala *et.al* (2016), lebih dari 90% aktinomisetes yang terisolasi di Pulau Enggano adalah dari kelompok marga *Streptomyces*. Penelitian tersebut menyebutkan, dari 23 isolat yang telah berhasil diidentifikasi berdasarkan sekuen gen 16S rRNA, sebanyak 22

isolat termasuk dalam marga *Streptomyces* yang terdiri dari 16 jenis.

KESIMPULAN

Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap 22 isolat aktinomiset asal Pulau Enggano dan Bali, diperoleh 5 isolat memiliki daya hambat terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. 5 isolat terpilih menunjukkan isolat-isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Streptomycesmutabilis*, *Streptomyces sp*, dan *Streptomyces griseorubens*.



Gambar 4. Pohon filogenetik isolat aktinomiset dengan metode *Neighbor-Joining* pada 1000 kali replikasi bootstrap.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada kepala dan seluruh staff laboratorium mikrobiologi terapan bioteknologi LIPI atas seluruh fasilitas dan bantuan selama menjalankan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adzitey, F. 2015. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. *World Vet J.* 5(3): 36-41.
- Aeny, T. N., Joko, P., Radix, S., Suskandini R. D., Efri, Ainin, N. 2018. Isolation and identification of actinomycetes potential as the antagonist of *Dickeya zae* pineapple soft rot in Lampung, Indonesia. *BIODIVERSITAS.* 19(6): 2052-2058.
- Anderson, A. S., Wellington, E. M. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 797-814.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*
- Davis WW & Stout TR. 2009. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Applied and Enviromental Microbiology*. 22 (4): 666-670.
- Lisdiyanti, P., Hiroko, K., Tatsuji, S. Yuzo, Y. Tai, U. Kazuo, K. 2001. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygiisp.* nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *The Journal of general and applied microbiology*. 47(3): 119-131.
- Miyadoh S., Otoguro M. 2004. *Workshop on Isolation Methods and Classification of Actinomycetes*. Bogor (ID): Biotechnology Centre, LIPI.
- Nurkanto, A., Heddy, J. Andria, A., Wellyzar, S. 2012. Screening Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Raja Ampat, West Papua, Indonesia. *Makara Journal of Science*. 16(1): 21-26.
- Rahmah, R. P. A., Meiskha, B., Yanti, H. 2017. Uji Daya Hambat Filtrat Zat Metabolit *Lactobacillus plantarum* Terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. *Jurnal Biogenesis UIN Alaudin*. 5(1) : 34-41.
- Ratnakomala, S., Pamela, A., Fahrurrozi, Puspita, L., Wien, K. 2016. Aktivitas Antibakteri Aktinomisetes Laut Dari Pulau Enggano. *Jurnal Ilmu-ilmu Hayati*. 15(3) : 275-283.
- Sulistiyani, N. dan Akbar, N.A. 2014. Aktivitas Isolat Actinomycetes dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai Penghasil Antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 12 (1) : 1-9.
- Wahyuni, D.S., Mirnawati, B., Sudarwanto, Puspita, L. 2014. Screening of Antibacterial Activities of Actinomycetes Isolates from Indonesia. *Global Veterinaria*. 13(2): 266-272.